

学位論文題名

Gene expression profiles in chronic myeloid leukemia and prediction of sensitivity to STI571 by genome-wide cDNA microarray analysis

(cDNA マイクロアレイを用いた慢性骨髄性白血病の発現プロファイル取得と STI571 に対する感受性予測の研究)

学位論文内容の要旨

近年、網羅的に遺伝子発現情報を解析する技術として、cDNA マイクロアレイや DNA チップが開発され、さまざまな分野で利用されている。特に、がんをはじめとする複雑な疾患背景を有する病態解析に有効であり、臨床的な応用を視野に入れた研究を進める上で重要な役割を担っている。遺伝子発現情報をさまざまな角度から解析することは、癌関連遺伝子群の同定に寄与し、現行の手法では解明の困難であった癌の発生・増悪過程の詳細な解明にもつながると期待されている。

本研究では、慢性骨髄性白血病(Chronic myeloid leukemia; CML)の病態の理解を深めるために、23,040 遺伝子のスポットされている cDNA マイクロアレイを用いて、健常人の末梢血より調整した白血球細胞をコントロールとし、CML 患者の末梢血より調整した CML 細胞の遺伝子発現を解析した。この解析においては、癌細胞を強く反映した遺伝子発現プロファイルを取得するために、Fluorescence in situ hybridization (FISH)を行い、CML のマーカーであるフィラデルフィア染色体(Ph 染色体)が 65%以上の細胞で認められた 27 サンプルを対象とした。それぞれの細胞から total RNA を抽出し、マイクロアレイ解析に十分な RNA 量を得るために T7RNA 増幅法を利用し、これを 2 サイクル行うことによって約 1 万倍に増やした aRNA (amplified RNA)を調整した。次に、調整された aRNA から逆転写反応を行いつつ、健常人サンプルは Cy3 で、CML サンプルは Cy5 でそれぞれ標識した。これら 2 種類のサンプルを同一スライド上で競合ハイブリダイゼーションさせ、専用スキヤナーで、各スポットの蛍光強度を読み取った後、数値化してデータを得た。このようにして得られたデータは、各スライド上にスポットされている 52 種類のハウスキーピング遺伝子を利用して、ノーマライゼーションを行い、コントロールに対する CML 細胞の相対的発現量比を求め、数値解析を行った。

マイクロアレイ解析によって、発現量がカットオフ値以上であったサンプルを対象として、半分以上の症例で発現量が健常者の細胞と比べて 5 倍以上に発現上昇した遺伝子が 150 個、発現量が 1/5 以下に低下した遺伝子が 106 個同定された。発現上昇の認められた 150

遺伝子中には 54 個の EST が認められた。発現量がカットオフ値以上の全症例において 5 倍以上の発現亢進の認められた 11 遺伝子については、半定量的 RT-PCR によって再現性を確認した。

多くの症例で発現亢進していた遺伝子には、ヘモグロビンファミリーであるヘモグロビンゼータ、ベータ、ガンマ G、デルタ、アルファ 2 があった。さらに、ハプトグロビンやハプトグロビン関連タンパクの発現亢進も認めた。本研究結果および Ph 染色体上に存在する BCR-ABL 遺伝子はヘモグロビンを産生させる能力があるとの報告から、BCR-ABL は赤血球系細胞の分化・増殖に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

また、近年、抗がん剤などの薬剤や放射線に対する感受性を規定する遺伝子群を同定することによって、個々の患者に適切な治療方法を選択するオーダーメイド医療の実現が望まれている。抗がん剤を投与する前に、その感受性を判定できれば、抗がん剤をより有効に投与することができ、無駄な投薬による副作用から患者を守ることにもつながるであろう。そこで、私は、得られた CML の発現プロファイルを利用して、抗がん剤感受性に関連している遺伝子群を同定し、その遺伝子群の発現情報に基づいた抗がん剤感受性の予測システムの構築を試みた。

本研究においては、CML の分子標的治療薬としてすでに日本国内でも承認されている STI571 (イマチニブ) に対する感受性の予測を試みた。STI571 の効果判定は、薬剤投与後約 150 日の時点で Ph 染色体陽性細胞の割合が 35% 未満 (細胞遺伝学的寛解) を感受性群とし、不変または増加を示した場合を耐性群と定義した。その結果、発現プロファイルを取得したサンプルから、感受性群として 12 例、耐性群として 6 例が解析対象として選出された。

はじめに、感受性群と耐性群の 2 群を特徴付けている遺伝子を permutation test によって抽出した。発現変動が有意に異なっていた ($p < 0.05$) 遺伝子を抽出した結果、STI571 の感受性に関連すると思われる 79 遺伝子が抽出された。

次に同定された 79 個の薬剤感受性候補遺伝子から、個々の患者の薬剤感受性を予測するシステムの構築を試みた。まず、薬剤感受性遺伝子の相対的発現量比を用いて、各症例に対してスコアを算出した。スコアの算出方法は、各感受性候補遺伝子で、感受性群と耐性群の発現量比の平均値からの差を求め、感受性群に近い場合はプラスのスコア、耐性群に近い場合はマイナスのスコアとして計算した。各症例は、薬剤感受性関連候補遺伝子の数だけスコアが与えられ、スコアの総和がプラスの場合は感受性群、マイナスの場合は耐性群とした。

また、permutation test から抽出された 79 遺伝子のうち、どの遺伝子セットを利用したときに 2 群の分離が最も明確にできるのかということ leave-one-out cross validation 法を用いて検証した。Leave-one-out cross validation 法によって薬剤感受性のスコアを計算するにあたって用いた遺伝子セットは、permutation test で最も有意な値を示した遺伝子から上位 5 遺伝子ずつを加算して行った。感受性群と耐性群が明確に分類されているという基準として、両群の差を示すために $CS[(\text{Classification Score}) = (\text{感受性群のスコアの平均} - \text{耐性群のスコアの平均}) / \text{両群の標準偏差の和}]$ という数値を用いた。したがって、CS

の値が高ければ高いほど、二群は明瞭に分類されていることを示している。その結果、感受性遺伝子が 15 もしくは 30 遺伝子のときに CS が最も高い値を示しており、感受性群と耐性群のスコアの分離が最も良いことが示された。

次に今回構築した薬剤感受性スコアリングシステムの妥当性を検証した。スコアリングシステムの構築には使用しなかった症例を用いて同様の方法でスコア化を行ったとき、実際の薬剤の感受性を反映している結果となるのかどうかを調べた。ここでは、テストサンプルである感受性 2 症例と耐性群 2 症例、そして薬剤感受性の予測のために最適な遺伝子セットである 15 もしくは 30 遺伝子を用いた。その結果、全ての症例において感受性を反映させたスコアが算出され、遺伝子の発現量に基づいて、発現プロファイルを元に STI571 の感受性を予測することが可能であることを強く示唆する結果が得られた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	木村正人
副査	教授	松田洋一
副査	教授	高木信夫(北星学園大学経済学部)
副査	助教授	鈴木仁
副査	助教授	北田一博

学位論文題名

Gene expression profiles in chronic myeloid leukemia and prediction of sensitivity to STI571 by genome-wide cDNA microarray analysis

(cDNA マイクロアレイを用いた慢性骨髄性白血病の
発現プロファイル取得と STI571 に対する感受性予測の研究)

近年、網羅的に遺伝子発現情報を解析する技術として、cDNA マイクロアレイや DNA チップが開発され、がんをはじめとする複雑な疾患背景を有する病態解析に用いられている。疾病にともなう遺伝子発現の変化に関する情報は、発症メカニズムの解明、そして治療方法の開発に欠かすことができない。

こうした状況を踏まえ、申請者は、本学位論文において、23,040 遺伝子のスポットされている cDNA マイクロアレイを用い、慢性骨髄性白血病(Chronic myeloid leukemia; CML)にともなう遺伝子発現の変化について解析した。解析には、健常人の末梢血より調整した白血球細胞をコントロールとし、CML 患者の末梢血より調整した CML 細胞を用いた。また、白血病細胞を強く反映した遺伝子発現プロファイルを取得するために、Fluorescence in situ hybridization (FISH) を行い、CML のマーカーであるフィラデルフィア染色体(Ph 染色体)が 65%以上の細胞で認められた 27 サンプルを対象とした。細胞から抽出した total RNA は必ずしもマイクロアレイ解析に十分ではないため、T7RNA 増幅法を 2 サイクル行うことによって約 1 万倍に増やした aRNA (amplified RNA) を調整した。次に、調整された aRNA から逆転写反応を行いつつ、健常人サンプルは Cy3 で、CML サンプルは Cy5 でそれぞれ標識した。これら 2 種類のサンプルを同一スライド上で競合ハイブリダイゼーションさせ、専用スキャナーで、各スポットの蛍光強度を読み取った後、数値化してデータを得た。このようにして得られたデータは、各スライド上にスポットされている 52 種類のハウスキーピング遺伝子を利用して、標準化し、コントロールに対する CML 細胞の相対的発現量比を求め、数値解析を行った。

マイクロアレイ解析によって、半数以上の症例で発現量が健常者の細胞と比べて 5 倍以上に発現上昇した遺伝子が 150 個、発現量が 1/5 以下に低下した遺伝子が 106 個同定された。全症例において 5 倍以上の発現亢進の認められた 11 遺伝子については、半定量的 RT-PCR によって再現性を確認した。

多くの症例で発現亢進していた遺伝子には、ヘモグロビンファミリーであるヘモグロビンゼータ、ベータ、ガンマG、デルタ、アルファ2があった。さらに、ハプトグロビンやハプトグロビン関連タンパクの発現亢進も認められた。これらの結果は、CML発病が赤血球系細胞の分化・増殖に影響を及ぼしている可能性を示唆するものである。

続いて、申請者は、上記研究により得られたCMLの発現プロファイルを利用し、CMLの分子標的治療薬であるSTI571（イマチニブ）に対する感受性に関連している遺伝子群を同定し、その遺伝子群の発現情報に基づいた感受性の予測システムの構築を試みた。抗がん剤などの薬剤や放射線に対する感受性を規定する遺伝子群の同定は、個々の患者に適切な治療方法を選択するオーダーメイド医療にもつながり、近年注目を受けている。抗がん剤を投与する前に、その感受性を判定できれば、抗がん剤をより有効に投与することができ、無駄な投薬による副作用から患者を守ることにもつながるであろう。

本研究では、STI571の効果判定は、薬剤投与後約150日の時点でPh染色体陽性細胞の割合が35%未満（細胞遺伝学的寛解）を感受性群とし、不変または増加を示した場合を耐性群と定義し、発現プロファイルを取得したサンプルから、感受性群として12例、耐性群として6例を解析対象として選出した。

まず、permutation testによって、STI571の感受性に関連すると思われる79遺伝子を抽出した。次に、この79個の薬剤感受性候補遺伝子の相対的発現量比を用いて、各症例に対して、感受性スコアを算出し、スコアの総和がプラスの場合は感受性群、マイナスの場合は耐性群とした。

また、permutation testから抽出された79遺伝子のうち、どの遺伝子セットを利用したときに2群の分離が最も明確にできるのかということ leave-one-out cross validation法を用いて検証した。さらに、感受性群と耐性群が明確に分類されているという基準として、両群の差を示すためにClassification Scoreを用いた。その結果、15もしくは30の感受性遺伝子を用いたときに、感受性群と耐性群のスコアの分離が最も良かった。

次に、今回構築した薬剤感受性スコアリングシステムの妥当性を、感受性2症例と耐性群2症例のテストサンプルを用い検証した。その結果、全ての症例において感受性を反映させたスコアが算出され、感受性遺伝子の発現量に基づいて、STI571に対する感受性を予測することが可能であると結論された。

以上のように、申請者は、慢性骨髄性白血病にともなう遺伝子発現の変化の詳細を明らかにし、また、この白血病の治療薬であるSTI571が有効に作用する患者、作用しない患者の予測に成功した。これらの成果は、がん発症のメカニズムの解明、治療薬の開発のみならず、遺伝子多様性の意義の解明にも結びつくものである。審査委員一同は、本研究を高く評価し、また申請者は、研究者として誠実かつ熱心であり、博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。